

RIJKSINSTITUUT VOOR VISSERIJONDERZOEK

Haringkade 1 - Postbus 68 - IJmuiden - Tel. (02550) 3 16 14

Afdeling: MILIEU-ONDERZOEK

Rapport: CA 85-08
Rood-kleuring van aal en baars, veroorzaakt door sportvissers, die rode maden of Mix 2000 met Sudanrood kleurstoffen gebruiken.

Auteur: Mia Kerkhoff, Nelly Scholtz, Arie de Vries, Jack Speur en Jan van Willigen.

Project: 7133

Projectleider: Mw. drs. M.A.T. Kerkhoff

Datum van verschijnen: december 1985.

	<u>pag.</u>
Inhoud:	
Samenvatting.	2
1. Inleiding.	3
2. Materialen.	3
3. Ontwikkeling van de chemische analyse.	4
3.1. Extractie.	4
3.2. Zuivering.	4
3.3. Detectie.	5
3.3.1. Oriëntatie.	5
3.3.2. HPLC	5
4. Identificatie en voorkomen.	6
5. Bronnen.	7
5.1. Hengelsportartikelen.	7
5.2. Aquarium experimenten.	8
6. Discussie.	9
Literatuur.	10
Tabellen en figuren.	

DIT RAPPORT MAG NIET GECITEERD WORDEN ZONDER TOESTEMMING VAN DE DIRECTEUR VAN HET R.I.V.O.

2291835

ROOD-KLEURING VAN AAL EN BAARS, VEROORZAAKT DOOR SPORTVISSERS, DIE RODE MADEN OF MIX 2000 MET SUDANROOD KLEURSTOFFEN GEBRUIKEN.

Mia Kerkhoff, Nelly Scholtz, Jack Speur, Arie de Vries en Jan van Willigen.

SAMENVATTING

Sudanrood kleurstoffen werden geïdentificeerd als de veroorzakers van rood-kleuring bij aal en baars. Een analyse methode werd ontwikkeld bestaande uit een Soxhlet extractie met pentaan, gevolgd door een zuivering met Bio Beads SX-3 gelfiltratie en kwantitatieve detectie met normale fase HPLC.

De in aal aangetroffen gehalten varieerden van < 0,1 tot 9,6 mg/kg voor Sudanrood 7 B en van 0,07 tot 6,9 mg/kg voor Sudanrood IV. Meestal waren beide stoffen aanwezig, waarbij beurtelings een van beide dominant was. Daarnaast werden nog minstens 4 andere rode kleurstoffen aangetroffen, die alle ook aanwezig bleken te zijn in het technische mengsel Oil red tax.

Door sportvissers gebruikte met Oil red 7 B of Oil red tax behandelde maden lijken de belangrijkste veroorzakers van de rode alen te zijn. De Sudanrood kleurstoffen konden in de maden worden aangetoond op een minimaal 10 voudig hoger niveau als in de vissen. Bij aquarium experimenten kregen met rode maden gevoerde alen al na drie weken een rode gloed en werd na 10 weken een gemiddeld Sudanrood IV gehalte van 14 mg/kg bepaald. Van de andere hengelsportartikelen bleken in Mix 2000, formule 4, lokaas voor witvis, eveneens alle in Oil red tax aanwezige stoffen te zitten, waaronder 580 mg/kg Sudanrood IV.

Volgens de Warenwet mogen Sudanroodkleurstoffen niet aan levensmiddelen worden toegevoegd. De belangrijkste bron van verontrusting van deze diazokleurstoffen vormt hun mogelijke kankerverwekkende werking. De uitgangsubstanties voor hun synthese zijn carcinogene stoffen en op grond van hun structurele overeenkomsten met erkend kankerverwekkende stoffen zijn ze potentieel verdacht carcinogeen. Dit ondanks het feit, dat de carcinogeniteit van de kleurstoffen zelf niet bewezen is. Het gebruik van deze stoffen in hengelsportartikelen lijkt daarom niet zo verantwoord. Enerzijds in verband met een mogelijk verhoogd kankerrisico voor de sportvissers en anderzijds om het feit, dat ze vis ongeschikt maken voor menselijke consumptie.

1. INLEIDING

Het was in september 1979, dat het RIVO met de eerste roodgekleurde aal geconfronteerd werd. Deze aal was afkomstig uit de Nieuwkoopse plassen en bereikte het RIVO via de Keuringsdienst van Waren uit Haarlem. Drie jaar later kwam er meer zicht op de rode kleur problematiek, toen de NVVS een tweetal roodgekleurde alen voor onderzoek aanbood. De roodkleuring was door het gehele visvlees waarneembaar met een sterkere intensiteit in de vethoudende weefsels. In de maag van een van beide alen werd een groot aantal (40 - 50 stuks) roodgekleurde maden aangetroffen. Omdat de absorptie spectra van extracten van zowel aal als maden sterk op elkaar leken werd aangenomen, dat de roodkleuring van de aal veroorzaakt was door de rode maden. Uit onderzoek van de Keuringsdienst van Waren, Haarlem, kwam vast te staan, dat de rode kleurstof geen overeenkomst vertoonde met een van de toegestane kleurstoffen voor levensmiddelen of cosmetica. Op dit punt aangekomen werd het onderzoek stopgezet zonder dat de identiteit van de stof was achterhaald (brief 6 december 1982, 3873/vB-H-7132).

Engelse hengelsporters maken zich al enige jaren zorgen over gekleurde maden. In de Angling Times van 10 maart 1982 wordt al melding gemaakt van een verbod op het gebruik van bronskleurige maden bij viswedstrijden in Wiltshire en de National Federation of Anglers verbod in 1984 het gebruik van gekleurde made in alle onder haar auspiciën georganiseerde viswedstrijden. Uit een onlangs gepubliceerde "incident case study" onder 240 nieuwe patiënten met kanker aan nieren en urinewegen uitgevoerd door de Universiteit van Birmingham kwamen significante verbanden naar voren tussen het voorkomen van de ziekte, rookgedrag en deelname aan viswedstrijden. De kankerpatiënten bleken 1,8 x meer aan hengelsport te doen en 2,0 x zo vaak te roken. 5% van de kankergevallen konden worden toegeschreven aan frequente blootstelling aan chrysoïdine-azo kleurstoffen, middels het gebruik van met deze stoffen gekleurde maden (G.Sole, 1985).

Bovengenoemde informatie en het toenemend aantal meldingen van roodgekleurde aal en ook baars maakte nader onderzoek naar de rode kleurstof dringend gewenst. Allereerst werd de chemische indentiteit van de rode kleurstof(fen) opgehelderd, waarna door onderzoek van hengelsport artikelen de herkomst van de kleurstoffen werd achterhaald.

2. MATERIALEN

Via hengelsporters en verschillende organisaties werden roodgekleurde vissen aangeboden voor onderzoek. In tabel 1 staan de gedetailleerde gegevens van die vismonsters gerubriceerd. De aquarium experimenten, welke onder 5.2. nader beschreven staan, leverden ook 2 monsters op ieder bestaand uit 5 alen. De details van deze monsters worden in tabel 2 gegeven. De vissen werden gefileerd en per vangplaats werden mengmonsters bereid door van ieder exemplaar een gelijke hoeveelheid visvlees te nemen en het vlees van alle exemplaren (1 tot 5 stuks) te zamen te homogeniseren in een Waring Blendor. De hengelsportartikelen, die bij een aantal winkels in de omgeving werden gekocht staan vermeld in tabel 3. De bij het onderzoek gebruikte kleurstoffen, die door de Nederlandse Kleurstoffen Industrie, Amersfoort en de Keuringsdienst van Waren, Rotterdam beschikbaar gesteld werden, zijn:

	kleur indexnummer	fabrikant
Oil red tax		NKI, Amersfoort
Oil red 7 B		NKI, Amersfoort
Sudanrood 7 B	26050	Bayer
Sudanrood IV	26105	Brocades Steeman
Sudanrood III	26100	Dr. G. Grübber & Co, Leipzig
Sudanrood B	26110	NKI, Amersfoort

3. ONTWIKKELING VAN DE CHEMISCHE ANALYSE

3.1. Extractie

De waarneembaar sterkere kleurintensiteit in de vette weefsels van aal wees in de richting van een goede extractie mogelijkheid met organische oplosmiddelen. Daartoe werd het visvlees homogenaat met een 3 keer zo grote hoeveelheid watervrij $\text{Na}_2 \text{SO}_4$ gewreven tot een droogpoeder ontstond. Na één nacht drogen vond Soxhlet extractie plaats met n-pentaaan. Bij een visueel volledige extractie van de rode kleurstof werd de Soxhlet procedure beëindigd (3-10 uur). De ingewanden van vis en de rode maden werden volgens dezelfde methode geëxtraheerd. Van de rode kleurstoffen in de hengelsportartikelen werden oplossingen in water, iso-octaan en aceton gemaakt door simpel mengen van het materiaal met het oplosmiddel. Mix 2000, een droog mengvoeder, werd zonder $\text{Na}_2 \text{SO}_4$ te gebruiken eveneens aan een Soxhlet procedure onderworpen.

3.2. Zuivering

Voor een goed verloop van de analyse was zuivering nodig. Vooral de tegelijk met de rode kleurstof mee geëxtraheerde vetten moesten verwijderd worden. Daartoe werden diverse vetverwijderingstappen uitgetest. Allereerst werd de bij de PCB/pesticiden analyse gebruikte aluminium oxide kolom chromatografie uitgeprobeerd. De $\text{Al}_2 \text{O}_3$ (actief basisch I, Merck no. 1076) werd behandeld met 5% bidest. Na één nacht equilibreren werd per monster (max 250 mg vet) 15 g $\text{Al}_2 \text{O}_3$.5% H_2O in een kolom met een diameter van 2 cm gebracht. Bovenop de kolom werd ongeveer 0,5 g $\text{Na}_2 \text{SO}_4$ aangebracht (M. Kerkhoff e.a., 1981). De elutie van de rode kleurstoffen geschiedde met n-pentaaan zo traag, dat werd overgegaan op 5 en zelfs 10% diëthylether/pentaaan. Helaas bleken er toen te veel vetten meegeëluëerd te worden, zodat naar een andere zuiveringsstap gezocht moest worden. Uitschudden van het vet met behulp van acetonitril leverde ook geen positief resultaat (M. Porter e.a., 1970). Bij een extractie van 10 ml rode kleurstof met aalvet in pentaaan met 3 keer 15 ml acetonitril bleken zowel het vet als de rode kleurstof hoofdzakelijk in de acetonitril fase terecht te komen.

De destructie van het vet met behulp van geconcentreerd $\text{H}_2 \text{SO}_4$ bij kamertemperatuur leidde tot destructie van de rode kleurstof en een behandeling met alcoholisch loog was net zo weinig succesvol. Volgens RIVO-voorschrift 84.12 (J. de Boer e.a., 1984) werd 1,6 g (rood) visvet met 18,4 g $\text{H}_2 \text{O}$, 20 ml 40% KOH en 20 ml ethanol 4 uur gerefluxed bij 90°C . Na afkoelen, en toevoegen van 7 ml ethanol bleek bij uitschudden met pentaaan dat de rode kleurstof verdwenen was.

Gelpermeatie chromatografie bleek wel de gewenste scheiding van de grote vetmoleculen en de veel kleinere kleurstof moleculen te geven. Analoog aan de door L. Johnson e.a. (1976) beschreven methode voor de zuivering van pesticiden werd 1 g rood vet opgelost in 10 ml tolueen-ethylacetaat (1:3)

gebracht op een kolom (lengte 30 cm diameter 2,5 cm) van Bio Beads SX-3. Toluëen-ethylacetaat werd gebruikt als elutiemiddel. De vetten kwamen terecht in de eerste 75 ml, waarna de rode kleurstoffen in de volgende 25 tot 40 ml elueerden. Na schoonspoelen van de kolom met nog eens 50 ml was deze weer gereed voor het volgende monster. De ethylacetaat en de toluëen (na toevoegen van 20 ml ethanol voor een azeotropische verdamping) werden met behulp van een rotavapor verwijderd, waarna de rode kleurstoffen afhankelijk van de concentratie in 1 of 2 ml iso-octaan werden opgenomen.

3.3. Detectie

3.3.1. Oriëntatie

Tijdens diverse fasen van het onderzoek werden van de rode kleurextracten absorptie spectra in het zichtbare gebied (200-600 nm) opgenomen met een Hitachi 100-80 Spectrofotometer.

Toen de aluminiumoxide zuivering stap 2 kleurfracties bleek op te leveren werd dunne laag chromatografie toegepast op kant en klare TLC Kieselgel-60 platen met een laagdikte van 2,5 mm (Merck no 5724). Iso-octaan/dibutylether (4:1) bleek de meest geschikte loop vloeistof te zijn. In de aal en maden extracten en in de voor de maden kleuring gebruikte stoffen Oil red 7 B en Oil red tax werden diverse kleurvlekken aangetroffen.

$R_F \times 100$	kleur	aal	maden	7B	red tax
35	roze	+	+	+	
23	geel				+
19	rood	+	+		+
15	rood	+	+		+
4-13	rood/bruin		+		+

Omdat de dunne laag chromatografie kwantitatieve beperkingen heeft werd ook de $Al_2 O_3$ kolomchromatografie verfijnd. Kolommen met een diameter van 6 mm gevuld met 5 g $Al_2 O_3 \cdot 0,5\% H_2O$ en geëlueerd met iso-octaan/dibutylether (9:1) leverden voor de diverse produkten verschillende gekleurde fracties op (zie ook fig.1).

Elutie volume (ml)	kleur	$\lambda_{max}(nm)$	aal	maden	7B	red tax	Mix 2000
9-14	roze	518,365	+	+	+		
13-20	geel	475,305				+	+
30-40	rood	508,345	+	+		+	+
40-55	rood	520,380	+	+		+	+

3.3.2 HPLC

Toen het oriënterend onderzoek aangaf, dat meerdere rode kleurstoffen aanwezig konden zijn, was het duidelijk, dat voor de definitieve detectie aan hoge druk vloeistofchromatografie gedacht moest worden. Hiervoor werd de Spectra Physics SP 8100 HPLC ingezet gekoppeld aan de SP 8400 UV/Vis detector en de SP 4200 computing integrator. De scheiding vond onder normale fase condities plaats:

Kolom: Supelco LC Si no 1074

lengte : 15 cm

I.D. : 4,6 mm

D.D. : 6,4 mm

dp : 5 µm

druk : 30 bar

elutie snelheid: 0,6 ml/min

temperatuur : 32° C

De elutie geschiedde isocratisch met iso-octaan/dibutylether (9:1) als eluens, dat bij een voorstudie de beste scheiding gaf bij een analyse tijd van maximaal 30 min. De kleine verschillen in de absorptie maxima van de diverse rode kleurstoffen maakten voor de detectie de keuze van één superieure golflengte onmogelijk, maar de keuze van 510 nm bleek een goede tussenoplossing te zijn (fig. 1).

Ten behoeve van de kwantitatieve analyse werden eerst de beschikbare kleurstoffen op zuiverheid getest om diegene te selecteren, die als standaarden konden dienen. Sudanrood IV, Sudanrood 7 B en Oil red 7 B gaven slechts één piek te zien in het chromatogram, terwijl Oil red tax, Sudanrood III en Sudanrood B respectievelijk 3, 3 en 4 hoofdpieken opleverden. De chromatogrammen van deze drie laatste stoffen gaven alle ook een piek voor Sudanrood IV te zien. Sudanrood 7 B en Oil red 7 B bleken één en dezelfde stof te zijn. Voor kwantificering waren dus twee zuivere stoffen beschikbaar: Sudanrood IV en Sudanrood 7 B. Stockoplossingen werden bereid door 10 mg op te lossen in 5 ml aceton en dit tot 50 ml aan te vullen met iso-octaan. De werkstandaarden (20 µg/ml) werden door 1 op 10 verdunning verkregen.

Alle monsters werden met behulp van HPLC onderzocht, waarbij kwantificering geschiedde met behulp van piekoppervlakken volgens een externe standaard methode. Het injectie volume bedroeg 10 µl. Zowel Sudanrood IV als Sudanrood 7 B konden nog bepaald worden bij een concentratie van 2 µg/ml in het extract. Uitgaande van een extract met 1 g vet, dat na zuivering via de Bio Beads SX-3 kolom in 1 ml iso-octaan gebracht wordt, komt de detectiegrens te liggen bij 2 µg/g vet. De detectiegrens in het uitgangsmateriaal is dan uiteraard afhankelijk van het vetgehalte van het monster en de hoeveelheid, die in bewerking genomen wordt. Voor de bepaling van Sudanrood kleurstoffen in gasolie en mengsels van gas- en dieselolie wordt door P. Ohs e.a. (1985) een vergelijkbare detectiemethode succesvol toegepast.

4. IDENTIFICATIE EN VOORKOMEN

Uit de eerste oriënterende onderzoeken bleek, dat bij de rood-kleuring van aal minimaal 3 verschillende rode kleurstoffen betrokken waren. Informatie van de NKI en de Keuringsdienst van Waren, Rotterdam (J. van der Burg, 1984) zetten ons op het spoor van de Sudan kleurstoffen. Voor het kleuren van maden worden Oil red 7 B en Oil red tax gebruikt. Oil red 7 B bleek Sudanrood 7 B te zijn, terwijl Oil red tax uit meerdere stoffen bestond, waaronder Sudanrood IV. In fig. 2 worden de chromatogrammen van een aantal karakteristieke extracten gegeven. Van alle bij het HPLC onderzoek aangetroffen pieken worden de relatieve retentietijden t.o.v. Sudanrood IV in onderstaand overzicht gegeven. De intensiteiten van de pieken in een aantal karakteristieke monsters worden door middel van de teken ++, +, o en - weergegeven.

r_t rel. t.o.v. IV	7 B	red tax	aal	maden
0,36	++	-	++	++
0,69 (geel)	-	+	-	-
0,78	-	++	+	++
0,92	-	o	o	+
1,0 (IV)	-	++	++	++
1,26	-	+	o	+
1,32	-	o	o	o

- ++ hoofdcomponent
- + belangrijke component
- o aanwezig
- afwezig

Uit het HPLC onderzoek kwamen Sudanrood 7 B en Sudanrood IV naar voren als de twee belangrijkste veroorzakers van de rode kleur in aal en ook baars uit verschillende gebieden van Nederland. Het was niet mogelijk om de identiteit van de derde belangrijke aanwezige piek te achterhalen, maar enige overeenkomst met de chemische structuur van Sudanrood IV valt wel te verwachten.

In aal werd Sudanrood 7 B aangetroffen in gehalten variërend van < 0,1 tot 9,6 mg/kg, terwijl de gehalten van Sudanrood IV varieerden van 0,07 tot 6,9 mg/kg. In de beide baarsmonsters werden < 0,02 en 0,66 mg/kg Sudanrood 7 B en 0,02 en 0,36 mg/kg Sudanrood IV aangetroffen. De gehalten in de ingewanden van de vis verschilden meestal iets van die in het visvlees. De beide kleurstoffen kwamen zelden in dezelfde verhoudingen voor en waren beurtelings de belangrijkste. De aanwezigheid van de andere kleurstofpieken bleek duidelijk afhankelijk te zijn van de aanwezigheid van Sudanrood IV. Hoe hoger het Sudanrood IV gehalte hoe hoger ook hun pieken waren. Het relatieve piekoppervlak van de derde belangrijke piek (r_t rel = 0,78) ten opzichte van het piekoppervlak van Sudanrood IV varieerde van 0,13 tot 0,57 met een mediaanwaarde van 0,23 (zie voor al deze resultaten tabel 4).

5. BRONNEN

5.1. Hengelsportartikelen

Het pathologisch onderzoek van 1982 wees uit, dat rode maden gezien moesten worden als belangrijke bron voor roodgekleurde vissen. Naast maden werden echter nog 7 andere roodgekleurde hengelsportartikelen onderzocht. Met behulp van drie verschillende oplosmiddelen (water, aceton en iso-octaan) werden oplossingen van de rode kleurstoffen gemaakt, waarvan absorptiespectra werden opgenomen. De resultaten van deze eenvoudige test staan samengevat in tabel 3. Het zal duidelijk zijn, dat de 3 in water oplosbare kleurstoffen wat betreft oplosbaarheid afwijken van de vetoplosbare Sudanrood kleurstoffen. Bij 2 andere artikelen ging de rode kleurstof geheel niet in oplossing en Rubi Verdur loste alleen op in aceton. De rode kleurstof in Mix 2000 bleek daarentegen in iso-octaan zeer goed oplosbaar te zijn en omdat ook het absorptiespectrum sterke overeenkomst vertoonde met dat van de Sudanrood kleurstoffen werd dit laatste produkt samen met de maden uitvoeriger met hoge druk vloeistof chromatografie onderzocht. De identiteit van de rode kleurstoffen in de andere hengelsportartikelen werd niet achterhaald, maar uit onderzoek van de Keuringsdienst van Waren, Rotterdam is gebleken dat voor kleuring zowel de volgens de Warenwet in levensmiddelen toegestane rode

kleurstoffen (E 102, E 122, E 124, E 180) als ook andere onbekende stoffen gebruikt worden (J. van der Burg e.a., 1984).

Het kwantitatieve HPLC onderzoek leverde voor de maden Sudanrood 7 B en Sudanrood IV gehalten op, die minimaal een factor 10 hoger waren dan die in de vissen (tabel 4). In het ene monster waren Sudanrood 7 B en Sudanrood IV in dezelfde orde van grootte aanwezig (resp. 35 en 51 mg/kg), terwijl in het andere monster Sudanrood IV dominant was (resp. 5,9 en 57 mg/kg). Ook de andere pieken van Oil red tax werden aangetroffen (fig. 2). Zo was het oppervlak van de piek met $r_{t \text{ rel}} = 0,78$ 0,28 x het oppervlak van de Sudanrood IV piek. In Mix 2000 kon geen Sudanrood 7 B worden aangetoond, wel werden alle in Oil red tax aanwezige stoffen gedetecteerd. Het gehalte aan Sudanrood IV bedroeg 580 mg/kg en de onbekende piek met $r_{t \text{ rel}} = 0,78$ had een relatief piek oppervlak van 0,49 ten opzichte van het oppervlak van de Sudanrood IV piek (tabel 4).

5.2. Aquarium experimenten

Om de bewijsvoering verder kracht bij te zetten werden met de beide verdachte hengelsportartikelen, maden en Mix 2000, aquarium experimenten uitgevoerd. In twee bakken van 50 x 50 x 100 cm, voorzien van beluchting en filters, werden 25 alen met een lengte van 20 tot 30 cm gebracht. In de ene bak werd met rode maden en in de andere bak met Mix 2000 (met water aangemaakt en tot een bal gekneet) gevoerd. Om enige afwisseling in het dieet aan te brengen werd af en toe met aasgarnalen (*Neomysis integer*) uit het Noordzeekanaal bijgevoerd. Het water in de bakken werd regelmatig verversd.

De experimenten begonnen op 10 oktober 1984. De rode maden werden vanaf het begin goed gegeten, terwijl Mix 2000 in het geheel niet gegeten werd. Dit laatste experiment werd daarom na een zekere tijd beëindigd met een negatief resultaat. De alen, die rode maden kregen, bleken in een goede conditie te zijn en al na 3 weken (31 oktober) begon bij sommige alen een rode gloed zichtbaar te worden. 8 november was ook het water enigszins gekleurd. Na 10 weken (17 december) werden de alen in schoon water geplaatst en op 18 december werd een monster van 5 exemplaren genomen (monster 18, tabel 2). De vissen werden gefotografeerd en het visvlees werd chemisch onderzocht. De overgebleven exemplaren werden vervolgens met ongekleurde maden gevoerd om een mogelijke kleurafname te kunnen zien. Op 18 januari 1985 werd opnieuw een monster van 5 alen genomen, dat op dezelfde wijze verwerkt werd (monster 19, tabel 2). Onder de overgebleven 15 alen brak toen helaas witte stip uit en diverse pogingen om dit te verhelpen mislukten. Regelmatig overleden er vissen en op 6 februari werd het experiment noodgedwongen beëindigd.

Het chemisch onderzoek wees uit, dat de beide Sudanrood kleurstoffen in de alen waren geaccumuleerd, waarbij voor Sudanrood IV een niveau (14 mg/kg) werd vastgesteld, dat circa 1,5 x zo hoog was als het maximaal in de natuur aangetroffen gehalte. Helaas zijn de gevoerde maden niet steeds parallel mee geanalyseerd, zodat over de mate van accumulatie niet zoveel kan worden opgemerkt. Dit zelfde geldt ook voor een mogelijke eliminatie. Alhoewel monster 19 (1 maand zonder rode maden) minder Sudanrood IV bevatte dan monster 18 (tabel 4) valt er gezien de biologische variabiliteit binnen een monstergroep van 5 exemplaren toch weinig te concluderen over een afname en helaas strooide de witte stip roet in het verdere verloop van het eliminatie experiment.

6. DISCUSSIE

Het onderzoek aan roodgekleurde vissen uit diverse Nederlandse binnenwateren heeft duidelijk uitgewezen, dat steeds dezelfde groep van Sudanrood kleurstoffen verantwoordelijk was voor de roodkleuring. Sudanrood 7 B en Sudanrood IV waren beurtelings dominant. Een gehalte van 1 mg/kg of meer kan met het oog goed geregistreerd worden. De gehalten in aal lagen doorgaans tussen de 0,1 en 10 mg/kg per individuele verbinding. Roodgekleurde maden zijn de belangrijkste veroorzakers van de rode kleur bij aal, maar de bijdrage van andere roodgekleurde hengelsportartikelen moet zeker niet onderschat worden. Met name Mix 2000 formule 4, lokaas voor witvis, kan gezien de aanwezigheid van Oil red tax vergelijkbare problemen opleveren.

Sudanrood kleurstoffen en ook andere diazo-, azo- en anthraquinone kleurstoffen worden als tracers gebruikt voor het merken van brandstoffen. In diverse landen is het wettelijk verplicht om brandstoffen met loodtoevoeging (b.v. alkyllood verbindingen) te merken (T. Youngless e.a., 1985). Voor dit doel worden in West Duitsland veel Sudanrood 7 B en structureel overeenkomstige verbindingen gebruikt, terwijl in Frankrijk vooral Sudanrood IV wordt gebruikt (P. Ohs e.a., 1985).

Het toepassen van allerlei synthetische kleurstoffen brengt zekere risico's met zich mee. De ontdekking van de Sudanrood kleurstoffen in aal en maden roept ogenblikkelijk vragen op, omtrent de betekenis van deze stoffen voor de mens en zijn ecosysteem. Volgens de Warenwet is het gebruik van Sudanrood kleurstoffen in levensmiddelen verboden. De Warenwet werkt voor voedseladditieven met een zogenaamde positieve lijst, waarop stoffen pas terecht kunnen komen na een uitvoerige toxicologische beoordeling, om zodoende de consument een veilig produkt te garanderen (Anon. 1982).

Bij dierexperimenten van Sudanrood 7 B en Sudanrood IV blijken bij ratten en muizen leverbeschadigingen te kunnen optreden, waarbij ook enkele carconomen werden aangetroffen (Deutsche Forschungsgemeinschaft, 1957). De mogelijke kankerverwekkende werking van deze kleurstoffen is feitelijk de belangrijkste bron van verontrusting. Dit komt vooral door de structuur overeenkomst van de diazokleurstoffen met bekende carcinogene stoffen, zoals β -naphthylamine (2-aminonafthaleen), benzidine (4,4'-diaminobifenyyl), o-toluidine (2-aminotolueen), botergeel (4-N,N-dimethyl-aminoazobenzeen), o-aminoazotolueen (o-aminodimethylazobenzeen) en 4-aminoazobenzeen. Diverse landen hebben kleurstoffen van de lijst van toegestane additieven voor levensmiddelen verwijderd, omdat ze gesynthetiseerd werden door een reactie van 2-aminonafthaleen met aniline (aminobenzeen), o-toluidine (2-aminotolueen) of m-xylydine (aminodimethylbenzeen), ondanks het feit, dat de carcinogeniteit van de kleurstoffen zelf niet bewezen was (I. Chernozemsky e.a., 1981). Ook voor de synthese van Sudanrood 7 B en Sudanrood IV worden kankerverwekkende stoffen gebruikt (zie Appendix 1). Sudanrood 7 B ontstaat door een reactie van 4-aminoazobenzeen met 2-N-ethylaminonafthaleen en Sudanrood IV uit 4-amino-2',3-dimethylazobenzeen en 2-hydroxynafthaleen. De uitgangsprодукten voor de synthese van deze beide Sudanrood kleurstoffen vertonen ook sterke structurele overeenkomsten met Chrysoïdine (2,4-diaminoazobenzeen), dat als bronskleurige maden kleurstof in verband is gebracht met het voorkomen van kanker aan de nieren en urinewegen bij sportvissers (G. Sole, 1985).

Chemisch gezien wijken de Sudanrood kleurstoffen belangrijk af van de hiergenoemde carconogene stoffen, omdat de vrije amino (NH₂-) groep ontbreekt en het zijn vooral de aromatische amines, die bekend staan om hun carcinogene werking. Het aangetroffen Sudanrood IV was echter

afkomstig van Oil red tax, een technisch mengsel en het gebruik van niet zuivere stoffen brengt extra risico's met zich mee. Zeker gezien het feit, dat ook de andere stoffen van het Oil red tax in de vissen aangetoond konden worden. Omtrent de zuiverheid en de specificaties van kleurstoffen, die in levensmiddelen gebruikt mogen worden heeft de EEG daarom dan ook richtlijnen ontwikkeld. Met name de hoeveelheid vrije aromatische amines moet aan strenge eisen ($< 0,01\%$) voldoen, terwijl bovendien de hierbovengenoemde kankerverwekkende stoffen niet detecteerbaar mogen zijn (K. Khera, 1979).

Het geheel aan beschikbaar gekomen gegevens overziend lijkt het langer toepassen van de Sudanrood kleurstoffen in hengelsportartikelen dan ook niet verantwoord. Het brengt mogelijk een verhoogd kankerrisico voor de sportvissers met zich mee en maakt bovendien de belaste aal en andere vis door de aanwezigheid van niet toegestane additieven ongeschikt voor menselijke consumptie. Het zou de Nederlandse hengelsporters sieren, indien zij het voorbeeld van hun Britse collega's zouden volgen en een verbod op het gebruik van gekleurde maden bij wedstrijden zouden afkondigen. Ten aanzien van de andere gekleurde hengelsportartikelen lijkt de eis uitsluitend gebruik van bij de Warenwet toegestane kleurstoffen voor levensmiddelen een alleszins redelijke te zijn.

LITERATUUR

- Anon. (1982). Het Additieven boekje. Een overzicht van toevoegingen aan drink- en eetwaren.
Staatsuitgeverij, 's-Gravenhage.
- Boer, J. de en P. Otte, (1984). Bepaling van PCB's in vis met behulp van verzeppen.
RIVO voorschrift 84.12.
- Burg, J.L.M. van der en J.R. Besling, (1984). Specialisatie kleurstoffen.
Jaarverslag 1984, Keuringsdienst van Waren, Rotterdam.
- Chernozemsky, I.N. en E. Boyland, (1981). Carcinogenicity of aromatic amines and azodyes and their role in the development of human cancer.
Uit: Environmental carcinogens selected methods of analysis. Vol.4 - Some aromatic amines and azodyes in the general and industrial environment ed. H. Egan
IARC publications no.40, 3-12.
International Agency for Research on Cancer, Lyon.
- Deutsche Forschungsgemeinschaft, Farbstoff-Kommission (1957),
Toxicologischen Daten von Farbstoffen und ihre Zulassung für Lebensmittel in verschiedenen Ländern, ed.
Prof.Dr. G. Hecht, Mitteilung 6, p.54-55, Franz Steiner Verlag. GmbH, Wiesbaden.
- Johnson, L.D., R.H. Waltz, J.P. Ussary en F.E. Kaiser, (1976). Automated gel permeation chromatographic cleanup of animal and plant extracts for pesticide residue determination.
J. of the AOAC 59, 174-187.
- Kerkhoff, M., J. de Boer en A. de Vries, (1981). 4 jaar PCB-onderzoek in aal uit Nederlandse binnenwateren (1977-1980).
RIVO-rapport CA 81-01.
- Khera, K.S. en J.C. Munro, (1979). A review of the specifications and toxicity of synthetic food colors permitted in Canada.
CRC Crit. Rev. Toxicol. 6, 81-133.
- Ohs, P. en H. Engelhardt, (1985). Quantitative flüssig-chromatographische Bestimmung von Sudanrotfarbstoffen in Heizöl und in

- dessen Gemischen mit Dieselkraftstoffen.
Fres. Z. Anal. Chem. 321, 337-341.
- Porter, M.L., S.J.V. Young en J.A. Burke, (1970). A method for the analysis of fish, animal and poultry tissue for chlorinated pesticide residues.
J. of the AOAC 53, 1300-1303.
- Sole, G. en T. Sorahan, (1985). Coarse fishing and risk of urothelial cancer.
The Lancet 8444, 1477-1479.
- Youngless, T.L., J.T. Swansiger, D.A. Danner en M. Greco, (1985). Mass spectral characterization of petroleum dyes, tracers and additives.
Anal. Chem. 57. 1894-1902.

Tabel 1. Specifieke gegevens van de onderzochte monsters

Nr.	RIVO-code	organisme	aantal	weefsel	vangplaats	datum	lengte (cm)	gewicht (g)
1		aal	1	vlees	Nieuwkoopse plassen	-9-'79		
2	229-1a	aal	1	vlees		22-11-'82	50	187
3	229-1b	maden	40-50	totaal	uit ingewanden nr.2	22-11-'82		4,3
4	229-2	aal	1	vlees		22-11-'82	52	227
5	283	aal	1	vlees	Zuid-Willemsvaart	4-9-'83		
6	287	aal	1	vlees (gerookt)	Maas (Sambeek)	15-3-'84		
7	314-1	aal	1	vlees	Ringvaart (Hillegom)	30-7-'84	40	91,8
8	314-2a	baars	1	vlees	Ringvaart (Hillegom)	30-7-'84	17,5	57,5
9	314-2b	baars	1	ingewanden	nr.8			1,8
10	327-1a	aal	3	vlees (mengmonster)	Muldenauw (Nijkerkernauw)	15-9-'84	26 29,5 29,5	34,4 45,2 51,8
11	327-16	aal	3	ingewanden	nr.10			10,1
12	327-2a	baars	1	vlees	Muldenauw (Nijkerkernauw)	15-9-'84	15	32,9
13	327-2b	baars	1	ingewanden	nr.12			
14	330	aal	1	vlees	Brielse meer	21-11-'84	38	105,3
15	214 A	aal	1	vlees	Rijn (Lobith)	3-12-'84		
16	367	aal	1	vlees (gerookt)	Ketelmeer	-7-'85	36	69
17	368	aal	3	vlees (mengmonster)	Vestinggracht (Naarden)	10-7-'85	27 26,5 36,5	27,4 24,9 92

Tabel 2. Monstergegevens aquarium experiment

Nr.	datum monstername	aantal	lengte (cm)	gewicht (g)
	10-10-'84	start experiment - rode maden als voedsel		
	17-12-'84	schoon water		
18	18-12-'84	5 alen	34,5	56
			27,0	26
			26,5	22
			24,5	17
			24,5	18
	18-12-'84	rode maden vervangen door ongekleurde maden		
19	18-1-'85	5 alen	27	19,7
			26	17,6
			23	14,5
			28	22,8
			23	11,2

20-1-'85 Witte stip.

6-2-'85 Experiment noodgedwongen beëindigd.

Tabel 3. Gegevens van rode hengelsportartikelen

Produktomschrijving	Oplosbaarheid *			Golflengte (nm) van de absorptie max.
	water	aceton	iso-octaan	
Maden color (paars-rode vloeistof) Rosa Special D.A.M. nr. 7678/001 Wolf-Rüdiger, Kremkus	+	-	-	(250), 548
Special Futter farbe nr. 7679/000 (rode vloeistof)	+	-	-	248, 425
Catchum Edible colour powder (rode vast stof)	+	-	-	(326), 502
Mix 2000 formule 4, lokaas voor witvis, Intravis	-	+	+	(345), 505
Shakespeare deegrood nr. 9547/003 Instant Kostra deeg	-	-	-	
Rubi Verdur (tube) "Albatros"	-	+	-	508
Hollands witvis deeg Catch (tube) Shakespeare nr. 9550	-	-	-	
Maden	-	+	+	(345), 505-520

* + rode kleur goed oplosbaar
- rode kleur niet oplosbaar

Tabel 4. Resultaten van de bepaling van Sudanrood kleurstoffen in de monsters

Nr.	Hoeveelheid (g) gebruikt monster- materiaal	Percentage (%) bij clean up		Gehalte (mg/kg)		Relatieve opp. van piek $r_{t \text{ rel}} = 0,78$ t.o.v. opp. Sudan IV
		Al ₂ O ₃	Bio B.	Sudan 7B	Sudan IV	
1	19	100		1,2	0,62	0,23
2	20	100		< 0,1	1,7	0,17
3	4,3	100		5,9	57	0,20
4	30	100		1,3	2,7	0,23
5	19	100		0,10	4,8	0,36
6	19	100		0,88	0,99	0,36
7	59		5	1,1	6,8	0,27
8	53		100	0,66	0,36	0,13
9	1,8		100	0,56	0,58	0,20
10	84		4	4,8	2,9	0,21
11	10		100	1,2	2,1	0,16
12	33		100	< 0,02	0,02	-
13	2,0		100	< 0,02	< 0,02	-
14	49		8	8,5	6,9	0,25
15	13		50	2,1	0,07	0,57
16	46		8	9,6	5,0	0,22
17	49		10	3,8	3,4	0,22
18	20		20	0,26	14	0,30
19	83		20	0,21	9,6	0,27
Rode maden	5 g	100		35	51	0,28
Mix 2000	100 g			-	580	0,49
Oil Red Tax				-	480 g/kg	0,61

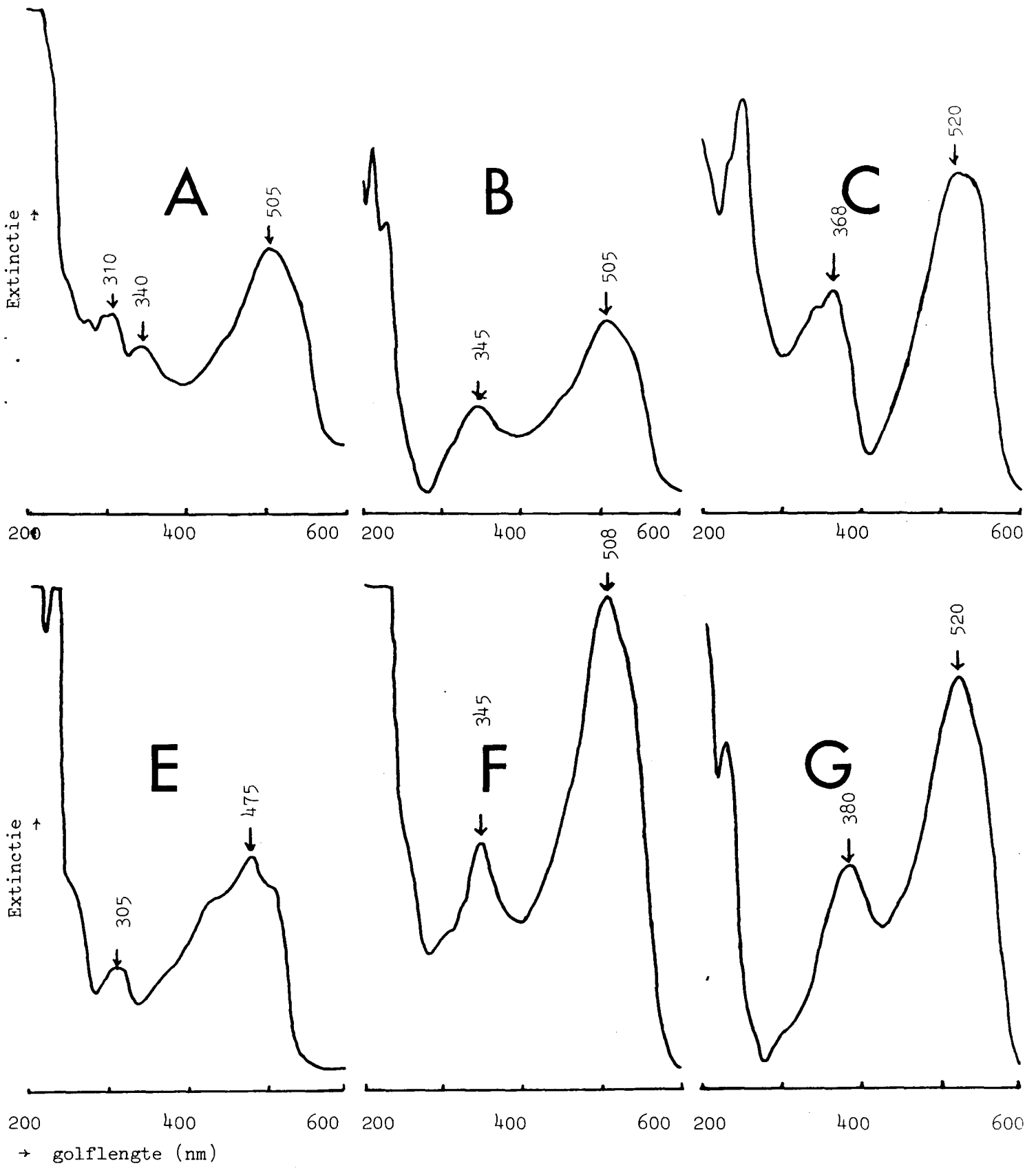
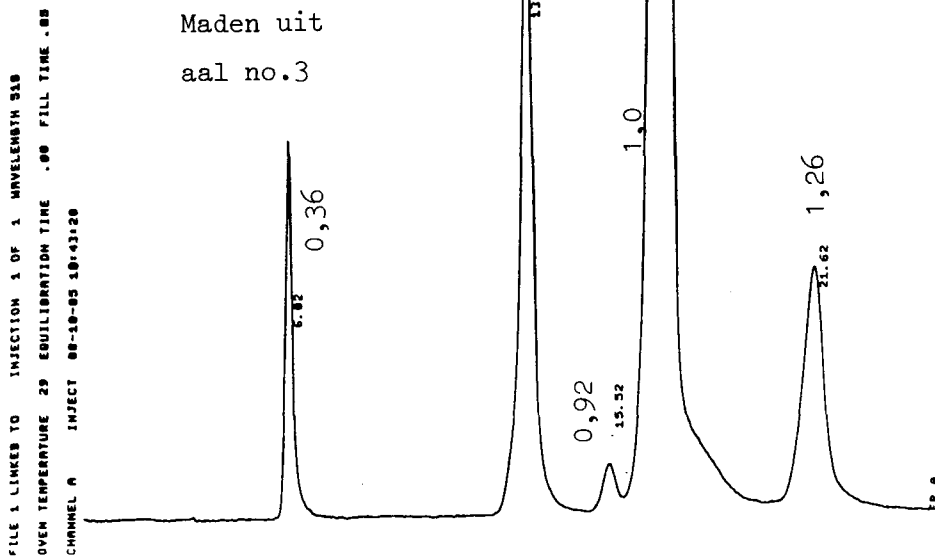
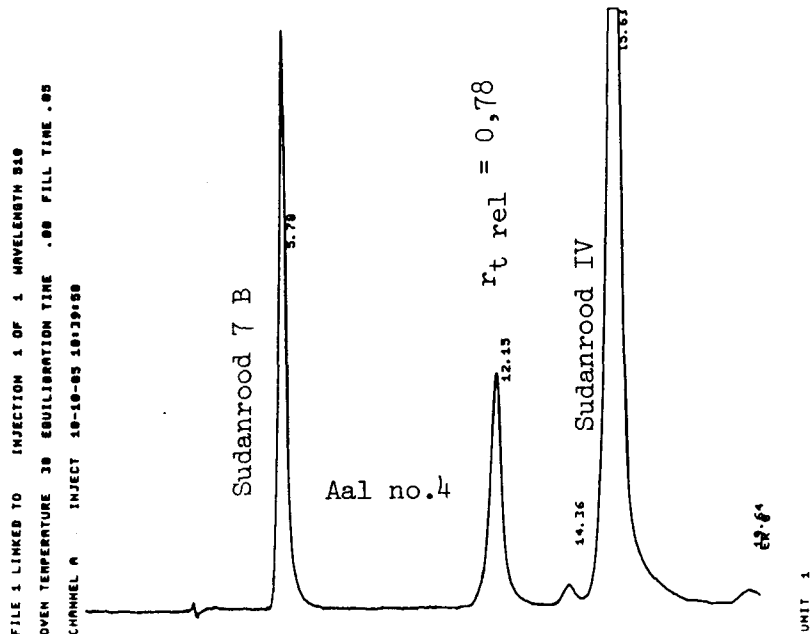


Fig.1. Absorptie spectra van rode kleurextracten.

- A: aal nr. 2 (ongezuiverd)
- B: maden 2e kleurfractie (rood)
- C: maden 1e kleurfractie (roze)
- E: Mix 2000 1e kleurfractie (geel)
- F: Mix 2000 2e kleurfractie (rood)
- G: Mix 2000 3e kleurfractie (rood)

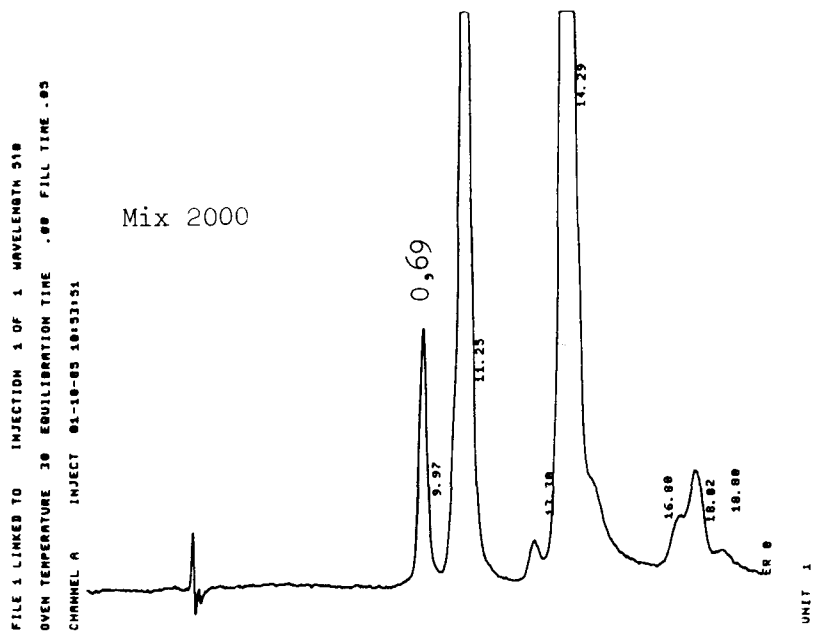


PEAK	AREA	RT	AREA BC
1	0.017	1.6	277.02
2	0.001	1.95	41.03
3	0.010	3.22	290.02
4	0.013	3.39	230.03
5	0.011	4.67	182.02
		4.87	124.02
TOTAL 100.			



PEAK	AREA	RT	AREA BC
1	24.722	5.78	130570.00
2	14.142	12.15	78250.00
3	61.139	15.63	342712.00
TOTAL 100.			

Sudanrood 7D
Sudan IV

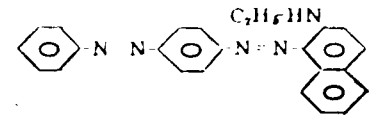
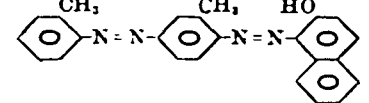
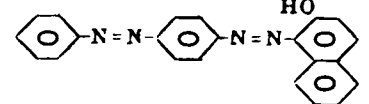
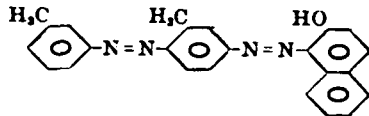
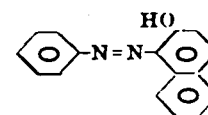
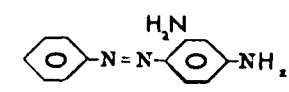
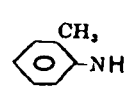
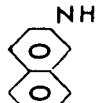


PEAK	AREA	RT	AREA BC
1	0.693	3.09	7020.02
2	1.487	3.92	14266.03
3	3.053	9.97	59427.02
4	20.317	11.25	207012.02
5	1.228	13.7	12448.02
6	56.078	14.29	568414.00
7	0.005	16.0	35.06
8	5.523	18.02	56003.06
9	0.076	18.0	0879.07
TOTAL 100.			

Sudan IV

Fig.2. Enkele karakteristieke chromatogrammen van rode kleurstof extracten.

APPENDIX 1: Structuurformules, naamgeving en eigenschappen van relevante verbindingen.

26050	C.I. Solvent Red 19 (Bright bluish red)	FIAT 764 — Sudanrot 7B Sudanrood 7 B
$\text{C}_7\text{H}_7\text{HN}$  <p><i>p</i>-Phenylazoaniline → <i>N</i>-Ethyl-2-naphthylamine</p>		Soluble in ethanol (carmine) Very soluble in acetone and benzene H ₂ SO ₄ conc. — brilliant greenish blue; on dilution — bluish violet to bordeaux
26105	C.I. Solvent Red 24 (Red)	FIAT 764 — Sudan Red BB M.p. 184–185°C
 <p>4-<i>m</i>-Tolylazo-<i>o</i>-toluidine → 2-Naphthol 4-amino-2',3'-dimethylazobenzeen</p>		Sudanrood IV Soluble in ethanol and acetone Very soluble in benzene H ₂ SO ₄ conc. — bluish green; on dilution — red ppt.
26100	C.I. Solvent Red 23 (Yellowish red)	Discoverer — F. Grässler Rumpff & Grässler, <i>BP</i> 5003/79; <i>FP</i> 134802 Krügener, <i>GP</i> 16482 (<i>Fr.</i> 1, 443) FIAT 764 — Sudan Red BK Sudanrood III Nietzki, <i>Ber.</i> 13 (1880), 800, 1838 Rowe & Levin, <i>JSDC</i> , 40 (1924), 226 Recrystallised from ethanol — brown plates with green metallic lustre, m.p. 195°C
 <p><i>p</i>-Phenylazoaniline → 2-Naphthol 4-amino-azobenzeen</p> <p>Note — Some commercial products are made from mixtures of <i>p</i>-phenylazoaniline and its homologues and are e.g. composed of C.I.26100 and C.I.26105</p>		Soluble in ethanol and acetone Very soluble in benzene H ₂ SO ₄ conc. — bluish green; on dilution — blue solution, then red ppt.
26110	C.I. Solvent Red 25 (Red)	FIAT 764 — Sudanrot B
 <p>4-<i>m</i>-Tolylazo-<i>m</i>-toluidine → 2-Naphthol 4-amino-2',3'-dimethylazobenzeen</p>		Sudanrood B Sudangeel azobenzeen-1-naft aleen-2'-hydroxy
		
		Chrysoïdine 2,4 diamino-azo-benzeen
		<i>o</i> -Toluidine 2-aminotolueen, 2-methylaniline
		β-Nafthylamine 2-aminonaf t aleen